

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

⑤ 日本国特許庁 (J P)

⑥ 特許出願公開

⑦ 公開特許公報 (A)

昭62-217161

⑧ Int. Cl.

G 01 N 33/569

⑨ 特許記号

⑩ 特許庁登録番号

7906-2G

⑪ 公開 昭和62年(1987)9月24日

審査請求 未請求 発明の数 3 (全22頁)

⑫ 発明の名称 増幅及びハイブリダイゼーションによるウイルスの検出方法及びキット

⑬ 特 願 昭62-2648

⑭ 出 願 昭62(1987)1月10日

⑮ 優先権主張 ⑯ 1985年1月10日 ⑰ 米国 (U S) ⑱ 818127

⑲ 発 明 者 ジョン ジョウジフ アメリカ合衆国、カリフォルニア 94303、ニル ソブラ
スニンスキイ ンテ、サンダーヘッド コート 4524
⑳ 発 明 者 デイビッド ヘンリー アメリカ合衆国、カリフォルニア 94702、パークレイ、
マフク ホプキンス ストリート 1, 1453
㉑ 出 願 人 シタス コーポレイション アメリカ合衆国、カリフォルニア 94508、ニミリービ
ル、フィフティナード ストリート 1400
㉒ 代 理 人 弁護士 青木 朗 外5名
最終頁に続く

明 記 書

1. 発明の名称

増幅及びハイブリダイゼーションによるウイルスの検出方法及びキット

2. 特許請求の範囲

1. ウイルスの単離体に対して実質的に保存されてあり、そして該ウイルス中の核酸に特異的であり、そしてアンプル中に含有されると予想される核酸配列の存在又は不存在を検出又は監視する方法であって、

(a) 前記アンプルを、前記核酸配列の各領域のためのオリゴヌクレオチドプライマー、1個以上のヌクレオシドトリホスフェート及び重合のための酵素により、一斉に又は別々に、ハイブリダイゼーション条件下で処理して、前記核酸配列の各領域について、検出又は監視されるべき核酸配列の各領域に実質的に相補的であるプライマーの生成物が生成されるようにし、こうして1万のプライマーから生成された延長生成物は、それらがその相補体から分離された場合、各々のプライマー

の延長生成物の生成のための模範として機能することができ；

(b) アンプルを反応条件下で処理して、検出されるべき配列が存在すればプライマー延長生成物をそれらの模範から分離し；

(c) 段階(b)の生成物をオリゴヌクレオチドプライマーで処理して、段階(b)に於いて生成した模範の各々を模範として用いてプライマー延長生成物が生成されるようにし、こうして検出されるべき配列が存在すればその相補をもちだし；そして

(d) 前記アンプル中に検出されるべき配列が存在するか否かを決定することを含んでなる方法。

2. 段階(d)が、

(1) 段階(c)の生成物に、増幅された核酸配列とハイブリダイズすることができ模範されたプローブを加え；そして

(2) 前記プローブが、前記核酸アンプル中の増幅された配列にハイブリダイズしたか否かを決定する；

疫毒を含んである特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 疫毒(a)において、ナンブル中のウイルスをミズリ変することなくナンブルを処理する、特許請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。

4. 前記ウイルスがAIDSウイルス、ヘビドナウイルス(hepadonavirus)、又はヘルペスウイルスである特許請求の範囲第1項〜第3項のいずれか1項に記載の方法。

5. 疫毒(a)及び(b)を少なくとも1回反復し、そして前記プライマーをAIDSウイルスの3'末端から、又はヘビドナウイルスのポリメラーゼ遺伝子もしくはニンボローブ遺伝子から選択する、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

6. 前記疫毒がDNAである特許請求の範囲第1項〜第5項のいずれか1項に記載の方法。

7. 前記疫毒がRNAである特許請求の範囲第1項〜第5項のいずれか1項に記載の方法。

8. 重合のための前記疫毒がE.コリ(E. coli) DNAポリメラーゼ、E.コリDNAポリメラーゼI

の範囲第1項に記載の方法。

11. 疫毒(b)が、

(i) 疫毒(a)の生成物を膜上にスプレッドし；そして

(ii) このスプレッドされた膜にプローブを放出する；

疫毒を含んである特許請求の範囲第2項に記載の方法。

12. 疫毒(b)が、

(i) 前記プローブを膜上にスプレッドし；そして

(ii) このスプレッドされた膜に疫毒(a)の生成物を放出する；

疫毒を含んである特許請求の範囲第2項に記載の方法。

13. ウイルスの単離体の間で実質的に保存されてなりそしてウイルス中の核酸に特異的である有価な核酸配列を含有する組成物であって、

(a) 凍結されていない形態の前記核酸配列を含有するナンブルを、核酸配列の各塩基のためのオリゴヌクレオチドプライマー、4種類の異なるヌク

レオチドの断片、塩基塩基対、又は核酸配列を生成するのに十分な塩基に基盤された核酸配列(a)及び(b)の間で反応環境において前記核酸配列を生成せしめるための核酸塩基を維持する組成物からなる群から選択される組成物である、特許請求の範囲第1項〜第7項のいずれか1項に記載の方法。

9. 疫毒(b)が、

(i) 疫毒(a)からのハイブリダイズした塩基対で、前記プローブ中の配列内のある塩基を認識する制限酵素により消化し；そして

(ii) この制限消化が検出されるべきウイルス配列の存在と関連する制限断片を含有するか否かを検出する；

疫毒を含んである特許請求の範囲第2項に記載の方法。

10. 前記ウイルスがAIDSウイルスであり、そして疫毒(b)及び(c)がAIDSウイルスゲノムの配列を含有し又は疫毒の疫毒を含有する遺伝子配列及び/又はAIDS単離体間からの配列を含有するいかなる疫毒も含有したい遺伝子配列を用いる、特許請求

の範囲第1項に記載の方法。

レオンとトリホスフェート及び重合のための疫毒により、一対に又は別々に、ハイブリダイゼーション条件下で処理して、疫毒配列の各塩基について、検出又は監視されるべき核酸配列の各塩基に実質的に相補的であるプライマーの延長生成物が生成されるようにし、ここで一万のプライマーから生成された延長生成物は、それがその相補体から分離された場合、各方のプライマーの延長生成物の生成のための標として機能することができ；

(b) 前記プライマー延長生成物をそれらがその上で生成された膜から分離することにより単離分子を生成せしめ；そして

(c) 疫毒(b)の生成物をオリゴヌクレオチドプライマーで処理して、疫毒(b)において生成した塩基の各々を標として用いてプライマー延長生成物が生成されるようにし、こうして前記核酸配列の検出をもたらす；

ことにより生成された前記疫毒。

14. 前記ウイルスがAIDSウイルス又はヘビドナウイルスである特許請求の範囲第13項に記載

の配列。

15. ウイルス中の複製配列の間で実質的に保存されており、そしてウイルス中の複製に特異的であり、そしてアンブレラ中に含有されると予想される複製配列の等三又是不等三を抽出又は整列するためのキャットであって、

(a) 抽出されるべき複製の各領域のためのオリゴヌクレオチドプライマー（この1又は複数のプライマーは各特異的複製配列の各領域に実質的に特異的であり、一のプライマーから合成された延長生成物は、それがその相補体から分離された場合、他のプライマーの延長生成物の合成のため誘発として機能することができ）；及び

(b) 複製複製配列とハイブリダイズすることができ複製されたプローブ；
を含有するキャット。

16. 前記ウイルスがAIDS ウイルス又はヘパタウイルスである特許請求の範囲第15項に記載のキャット。

17. 重合のための試薬、4種類の異なるヌクレオ

チド、シグナールを含むキャットに使用する。

【従来の技術】

先天性免疫不全症候群 (AIDS) はしばしば慢性的な日和見免疫又は新生物をもたらす免疫性免疫系の三免疫疾患である。さらに、AIDS はしばしば中枢神経系機能障害を合併する。この疾患を引起する病原体はヒトレトロウイルスとして同定され、そしてヒトT細胞白血病ウイルスⅡ (HTLV-Ⅱ)、リンパ腺癌関連ウイルス (LAV又はLAV-1)、及びAIDS 関連ウイルス (ARV-2) と命名されている。さらに最近、これらのウイルスはヒト免疫不全ウイルス (HIV) と名称されている。種々の研究からこの病原体は種々の宿主（すなわち、形態、エンベロープ蛋白質及びヌクレオチド配列）の免疫学的交叉反応性、並びにT4抗原を用いるヘルペス細胞への導入）により同一であるか又は密接に関連したウイルスを示している。ヒトに与えるAIDSと区別できない症状を有するナンバングー及びマカーク (macaque) から単離され

シトトリホスフェートの各々、及び前記プローブと複製配列とのハイブリドを抽出するための手段をさらに含んでなる特許請求の範囲第15項又は第16項に記載のキャット。

18. 前記ウイルスがAIDS ウイルスであり、そして前記キャットがAIDS ウイルスゲノムの配列を有する1もしくは複数の複製を含有する等三又三対、及び/又はAIDS ウイルスゲノムの配列を有するいくつかの複製も含有した等三又三対、及び予想される配列を含有する複製をプローブ中の配列に与えられる特定の制限部位において特異せしめることができる1つの制限酵素をさらに含んでなる特許請求の範囲第15項〜第17項のいずれか1項に記載のキャット。

1. 発明の理由と説明

【産業上の利用分野】

この発明は、ウイルスの検出された特定のヌクレオチド配列の等三又是不等三を抽出するための方法に関する。この発明はまた、このような抽出のためのプライマー及び複製されたハイブリダイ

シトトリホスフェートの各々、及び前記プローブと複製配列とのハイブリドを抽出するための手段をさらに含んでなる特許請求の範囲第15項又は第16項に記載のキャット。

AIDS に関連するウイルスについての一連の報告をせる結果は、レツタウイルス (Leontiviridae) 亜科の原形ウイルスとのそれらの類似性である。この類似性であるがしかし病態性ではないウイルス群の成員にはヒスマ (virus) ウイルス、及びクマカク性白血ウイルスが含まれる。AIDS 関連ウイルスとレツタウイルス (Leontiviridae) との間の類似性にはレツタの形態、免疫学的交叉反応性、ヌクレオチド配列、遺伝子配列、複製、及び宿主不特異性 (heterogeneity) が含まれる。

AIDS 関連ウイルスに対する抗体を含有する血清を同定するための最近の免疫学試験 (Call: 等の米国特許第4,320,113号を参照のこと) は特異的に感染性の血清を抽出するために血液成分に対して使用されている。HTLV 群中のレトロウイルスを抽出するためのモノクローナル抗体の調

致に於いて有用なレトロウイルスポリメラーゼに
ついては1985年3月27日に公開された
WO 86/01834(カリホルニア大学)を参照
のこと。AIDS 関連ウイルスと一般にレトロウイ
ルス又は特にヒトウイルスとの類似性が有るた
めのウイルス粒子を生成することなくDNAコピー
として存在するウイルスの能力に於いてあるため、
AIDS 関連ウイルスを放出するための従来の免疫
学的方法は、一貫して感染しているが感染を有し
ない個体の有意な割合に於いて不成功であること
が証明されよう。感染された細胞及び血清中のウ
イルス粒子の数は少ない(ウイルスが無活動であ
るため)ため、感染された細胞を培養してセルフ
インと共に同時培養したければウイルス粒子又は
RNA/DNAを直接放出することは不可能ではない
にしても困難であろう。同時培養を行ったとし
ても、ウイルスの単離により示されるHIVにより感
染された個体の数は、感染された個体の数の比
り減少である。すなわち、AIDS 患者の50%、
ARCの85%、及びAIDS の発症がある健康な個

体の30%のみからウイルスが単離される
[Salahaddin 等, PNAS USA, 82, 5530-4
(1985)]。

Salki 等, Science, 230, 1350-1354
(1985) は、複製配列の抽出を促進するために添
加されたRNA又はDNAハイブリダイゼーション、ン
プローブを使用して複製配列を増幅する方法を記載
している。この方法に於いては、プライマーを使
用してプライマー延長生成物を増、これを複製と
して使用してこのヌクレオチドの存在下で追加の
複製鎖を合成する。Salki等の論文に於いては、プ
ローブを所望の配列にハイブリダイズせしめた後、
複製酵素を加えてハイブリッドを所望の配列の両
端で複製せしめ、そして次に複製産物を複製化
断片について分析する技法を記載している。

Salki 等, Biotechnology, 3: 1008-1012
(1985) はこの技法の改良を一通り詳細に記載して
いる。

Ladner 等, Clin. Lab. Med. (1985) 3,
513-529 の記載はウイルスの抽出に使用さ

れる複製ハイブリダイゼーションの分析を記載し
ている。1985年3月13日に公開された
WO 86/01535、及び1985年3月5日に公開
されたEP 1 733 29 はHTLVの分子クローニ
ング及びAIDS を抽出するためのプローブとして
このクローンの使用を指示している。さらに、
1985年3月5日に公開されたEP 特許出願
1 733 39 は、外来微生物の感染を抽出するた
めのDNAプローブを使用する遺伝子分析を指示し
ている。1985年5月25日に公開された
EP 1 854 44 は細胞培養物中のHTLVウイル
スを抽出するためのプローブとして使用する複製
ベクターを指示している。オンコーン社(Oncor
Inc.)は、1985年9月に、AIDS ウイルス
を抽出するための放射線免疫試験を開発したと公
報した。米国特許4,591,552は、アンパル
中の抗原、特に肝炎B抗原の存在を抽出するた
めの複製化プローブの使用を指示している。

以下各章

[問題が解決しようとする問題点]

感染ウイルス、例えばAIDS ウイルス及び他の
ウイルスを抽出するためのハイブリダイゼーション、
ンプローブの使用は、一貫して感染しているがし
かしウイルスを生成しない個体、又は抗体反応が
性であるが複製能性である個体の同定を可能にし、
そしてウイルスを増養することを容易としたい
感染細胞を抽出することを可能にするであろう。
複製によるウイルスのウイルス複製コピー数の増
加に感染された個体に於けるウイルス複製の同定
を促進するであろう。

[問題点を解決するための手段]

本発明は、ウイルスの単離体間で免疫学的に区
別されておりそして該ウイルス中の複製に特異的で
あり、そしてアンパル中に存在されると予想され
る複製配列の存在又は不存在を抽出又は増強する
方法であって、

(a) 感染アンパルを、複製複製配列の各鎖のた
めのオリゴヌクレオチドプライマー、4鎖の第

るヌクレオチドトリホスフェート及び混合のための試薬により、一斉に又は別々に、ハイブリダイゼーションを条件下で処理して、前記複製配列の各領域について、検出又は監視されるべき複製配列の各領域に実質的に相補的である各プライマーの延長生成物が合成されるようにし、ここで、これらのプライマーは検出又は監視されるべき複製の各領域と実質的に相補的であり、こうして1つのプライマーから合成された延長生成物は、それがその前駆体から分離された場合、他のプライマーの延長生成物の合成のための模範として機能することができ；

(a) テンプレを反応条件下で処理して、検出されるべき配列が存在すればプライマー延長生成物をこれらの模範から分離し；

(c) 段階(b)の生成物をオリゴヌクレオチドプライマーで処理して、段階(b)において生成した領域の各々を模範として用いてプライマー延長生成物が合成されるようにし、こうして検出されるべき配列が存在すればその複製をもたらし；そして

な複製の混合物であるようにすることができ、さらに、段階(d)において処理されるべきテンプレはあらかじめテンプレ中のウィルスを複製する工程にかける必要はない。

この態様において、本発明は、ウィルス中の複製配列の間で実質的に保存されておりしてウィルス中の複製に特異的であり、そしてテンプレ中に含有されると予想される複製配列の存在又は不存在を検出又は監視するためのキットであって、

(i) 検出されるべき複製の各領域のためのオリゴヌクレオチドプライマー（この1又は複数のプライマーは各特異的複製配列の各領域に実質的に相補的であり、一のプライマーから合成された延長生成物は、それがその前駆体から分離された場合、他のプライマーの延長生成物の合成のための模範として機能することができ）；及び

(b) 前記複製配列とハイブリダイズすることができる複製されたプローブ；

を含んでなるキットに關する。

併ししくは、このキットはさらに試薬のための

(d) 前記テンプレ中に検出されるべき配列が存在するか否かを決定する；

ことを含んでなる方法に關する。

併ししくは前記配列はHIV(AIDS) ウィルス及び肝炎Bウィルス中のものである。

生成物を検出するための1つの方法は、段階(i)の生成物に、増幅された複製配列とハイブリダイズすることができる複製されたプローブを添加し、そして該プローブが複製テンプレ中の増幅された配列にハイブリダイズしたか否かを決定することによる。1つの態様において、この決定は、

(ii) ハイブリダイズした生成物をプローブ中の配列内の部位を認識する制限酵素により消化し；そして

(2) 前記消化物が検出されるべきウィルス配列の存在と関連する断片断片を含有するか否かを検出する；

ことにより行うことができる。

段階(i)の前に、テンプレ中の複製をそこから抽出して、処理したテンプレを棄却し、抽出され

試薬、4種類の異なるヌクレオチド、及びプローブと配列とのハイブリドを検出するための手段を含む。

本発明のキットは研究、臨床試験及び他の診断的用途において使用することができ、さらに、このキットはウィルスを複製することなく複製産物を検出するために使用することができ、これは感染を診断するために種々の感染病により治療された患者を監視するために有用な利便である。（具体的な説明）

この明細書において「ウィルス」となる語は、ウィルス中の複製の間で実質的に保存されておりして複製に特異的である配列を有する任意の単離体、又は一定の伝送する単離体に關する。このようなウィルスの例にはHIV、肝炎Bウィルス、ヘルペスウィルス、肝炎Aウィルス、リノウイルス(rhinovirus)、乳頭腫（パピローマ）ウィルス、エボラウイルス、ニースマイン（ニースマイン）ウイルス等が含まれる。この発明の示さしウィルスはAIDS及び肝炎Bウィルスである。

本発明は、ウィルスに関連する複製配列を含有すると予想される複製テンプレ中の複製配列を

放出し又は複製するための万全又はキットに属する。以下の説明は特にHIV及び肝炎Bウイルスに属するが、この明細書に定義するあらゆるウイルスに適用することができる。

HIVは非常に多様であるから、AIDS 関連ウイルスの高度な割合を放出するために使用するた
るには、ウイルスのペリアントに共通な要素
(本発明において定義する特異的プライマーが置
合を開始することを可能にする塩基を有する受容
された領域)を見出すことが必要である。有量な
割合とは、試験を診断的又は商業的に実施可能な
ものとするのに十分な個体の数を意味する。最近、
4種類のHIV、ARV、HTLVII、LAV、及びLAV
が配列決定され、そして5種類のヒト肝炎Bウイ
ルス、並びにウードナック(woodchuck)、グラ
ウンド・スクイレル(ground squirrel)及びア
ヒルに感染する猿猴ウイルスが配列決定された。
最初の4種類のHIV及びそれらの猿猴ウイルスは、
この明細書において“AIDS ウイルス”と称し、
そして5種類の肝炎Bウイルス、並びにウードナ

ック、グラウンド・スクイレル(ground
squirrel)及びアヒルに感染する肝炎B猿猴ウイ
ルスを“ヘパドナウイルス(hepadnavirus)”と
称する。複製されるべき配列はまたAIDS ウイル
ス又はヘパドナウイルスに特異的になければなら
ない。すなわち、それぞれ、HTLVIIもしくはHTLVII
又はヒト肝炎Bウイルスと反応してはならず、
又は非-ヘパドナウイルスと反応してはならぬ。

4種類のHIV単離体及びそれらのペリアントの
完全なゲノムは、ARV についてはSilva等、
227, 484-492; HTLVII についてはStrick
等、Silva等、227, 538-540(1985); LAV
についてはWalter-Hoebgen等、Cell, 40,
9-17(1985); 及びLAV についてはMuller
等、Nature, 313, 450-458(1985)により与
えられている。これらのウイルスはすべて同じ基
のペリアントであるという一般の合意が得られる。
これらは1つの種の中に保存されている。すなわ
ち、これらはペリアントを有しない。

アヒル肝炎Bウイルスの完全なゲノムは、J.

Virol., 49: 782-792(1984) 中に、そして
ヒト及びウードナックウイルスゲノムは、J.

Virol. 中に引用された文献中に与えられている。
グラウンド・スクイレル(ground squirrel)肝
炎Bウイルスの完全なゲノムは、J. Virol., 41:
51-55(1982) 中に与えられている。

放出されるべき配列に適用される“実質的に受
容されている”なる用語は、少なくとも重複に
いて置きのための複製及び4種類のスクレオシ
トリホスフェートの存在下で置きを開始するの
に十分なだけ、その配列が放出されるべきウイルス中
の領域に相補的であればならないことを意味する。

使用されるプライマーは、ウイルス中の有量な
数の複製上での置きの特異的開始をもたらすよう
な塩基の長さで配列を有するオリゴヌクレオチド
であろう。特に、この明細書で使用する場合、
“プライマー”なる語は、2個又はそれより多
くの、さらに好ましくは3個より多くのデオキシリ
ボヌクレオチド又はリボヌクレオチドからなる分
子であって、複製に対して実質的に相補的であ

るプライマーは複製開始の合意が相補される受容
下、すなわちスクレオシトリホスフェート及び
DNAポリメラーゼのごとき置合用酵素の存在下
で置き及び配列に置かれた場合に合意の開始点と
して機能することができる分子を意味する。プ
ライマーは、複製に与ける最大の効率のため、好
ましくは単量であるが、2本鎖でもよい。2本鎖の
場合、複製開始物の調製のために使用される前に、
プライマーはまずその2本の鎖に分離される。好
ましくは、プライマーはオリゴデオキシリボヌ
クレオチドである。プライマーは、置きのための
複製の存在下で複製開始物の合意を開始するた
めに十分な長さでなければならぬ。プライマーの
正確な長さは、塩基、塩酸塩、プライマーのスク
レオチド組成及び由来を含む多くの因子に依存す
るであろう。この発明の目的のため、オリゴヌ
クレオチドプライマーは典型的には15〜25又は
それより多くのスクレオチドを含有することである。
ウイルスがAIDS ウイルスである場合、プライ

な鎖 (3^+) 及び (3^-) を含んでなる所望の配列 (S) を含む2本鎖DNAが模範として使用される。第1の及びこれに続く反応サイクルの間、もとの鎖型上での各オリゴヌクレオチドプライマーの延長が、プライマーの1つのみにより停止する無制限の新しい、DNA分子生成物を生成する。今後“長生成物”と称するこれらの生成物は連鎖的に蓄積するであろう。すなわち、ある数のサイクルの後には存在する重がサイクル数に比例するであろう。

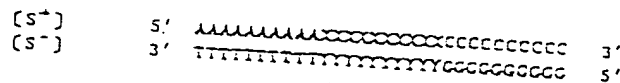
一ツ、ン以外のオリゴヌクレオチドヘイプリメイション、ンにより生成される鎖は自己増殖的ではなく、そしてそれ故に連鎖的に蓄積する。

以下余白

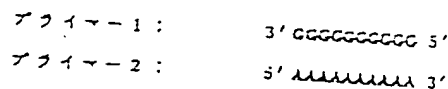
こうして生成された長生成物は、その後のサイクルの間一方又は他方のオリゴヌクレオチドプライマーの鎖型として機能し、そして所望の配列 (3^+) 又は (3^-) の分子を生成するであろう。これらの分子もまた、一方又は他方のオリゴヌクレオチドプライマーの鎖型として機能してさらに (3^+) 及び (3^-) を生成し、そしてそれ故に、サイクル数に対して指数的速度での (S) の蓄積をもたらすであろう鎖反応が継続される。

生成されるオリゴヌクレオチドヘイプリメー

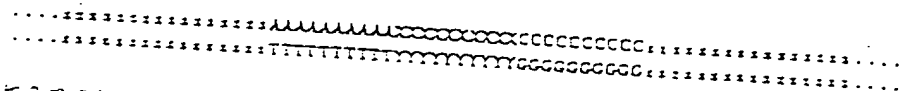
鎖されるべき所望の配列 (S) を次の様に模式的に表すことができる。



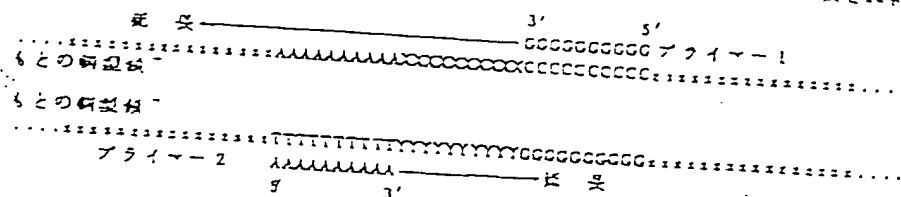
対応するオリゴヌクレオチドプライマーは次の通りであろう。



従って、 (S) を含むDNA:



が単鎖に分離され、そしてその単鎖がプライマー1及び2とヘイプリメイズし、4個のデオキシリボヌクレオシドトリホスフェートの存在下、DNAポリメラーゼの存在下で次の延長反応が触媒される。




生成した2つのデオキシリボヌクレオシドの存在下、次の生成物が生ずる。

5' 3'

との断片は


3' 5'

6 と 0 の 2 個

5'  3'

新たに合成された生体分子

及びタイトルにおいて、これら4つの紙をプライマー1及び2とヘイブライズとせしめたが、混合紙は
は紙の両面を加工するであろう。

プライマー2 5'  3' 5' 新たに合成された塩基配列

5' ... GGGGGGGGGG 5'プライマー 1
との類似度

プライマー-2
3' 5' AAAAAAAAAA ————— TTTTGGCCCGGGGGG..... 5'

6 との相違点 -

ここに接合
5' AAAAAAAAAA GGGGGGGGGG 5'プライマー-1
新たに合成された共価結合物 2 CCCCCCCCCCXXXXXXXXXXXXXXX 3'

上記4種類のア、アレックスが分断されたばかりの時に生ずる。

5' AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'
新たに合成された (5')

3' YGGGGGGGGGG 3'
第1アイクルで合成された長鎖双鎖1

3' YGGGGGGGGGG 5'

5'
 もとの鎖は短く

5' AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CCCCCCCCCC ::::::::::::::::::::... 3'

新たに合成された長生型

3' TTTT..... CCCCCC 5'

3' TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT YGGGGGGGGG 5'
折れた会盟された(5')

5' AAAAAAAAAA CCCCCCCCCC :::::::::::::::::::: 3'
第1アイクルで合成されたDNA鎖

0～nタイクム後の2本鎖の数

1つのプライマーのオリゴヌクレオチド配列で
停止する各鎖及び他方の相補鎖は生成することが
所望される特定の複製鎖(S)であることがわかる。

この工程の反復は無限に反復することができ、
プライマー1及び2、終末端及び存在するヌクレ
オチドによってのみ限定される。もとのヌクレオ
チドは複製されないため、その量に全工程を通じて
一定に維持される。長生成物にもとの複製から
のみ生成されるのでその量は指数的に増加する。
特定の配列の量は指数的に増加する。すなわち、
特定の配列は支配的役割となる。これは次の表に
示される。この表は、各タイクムの割合を100
として、nタイクム後に存在する鎖の相対量を示す。

タイクム数	鎖数	長生成物	特定の配列 (S)
0	1	-	-
1	1	1	0
2	1	2	1
3	1	3	4
5	1	5	25
10	1	10	1013
15	1	15	32,752
20	1	20	1048,555
n	1	n	$(2^n - n - 1)$

以下を例

例として単鎖ヌクレオチドが使用される場合、
タイクム毎に1本のみの長生成物が生成する。

この明細書に於いて使用する場合は、"制限ニ
ズヌクレアーゼ"及び"制限酵素"なる語は、特
定のヌクレオチド配列に於いて又はその近傍に於
いて2本鎖DNAを切断する制限酵素に關する。

この発明のプライマーに於ける反復により選択す

ることができ、この反復は考慮すべき要素である
が必ずしも決定的でもない。

第1に、プライマーはウイルスゲノムの任意の
領域から選択される。AIDSゲノムの場合には
p24領域(ヌクレオチド位置24)がコ
ード領域の最も保守された領域であり、p21及び
p27領域がこれに続く。従ってp24領域が最初
の研究のために選択された。肝炎Bゲノムの場
合には、ゲノムの全コード領域が1つの領域で保守
されている。

第2に、プライマーは反復を誘導すると予想さ
れるウイルスゲノムのいかなる配列とも相同性を
有しない。例えば、Salk, M. 等, PNAS (USA)
80:3513-3522(1983)により発表され
たHTLVの配列はAIDSの反復を誘導するであら
う。

第3に、プライマーは好ましくは複製された基
因に於いて二重鎖を形成しない。この二重鎖は
複製酵素、例えば、コリ DNAポリメラーゼ、
好ましくは DNAポリメラーゼの Klenow 断片と称

する部分による反復を誘導するであろう。これは、
複製媒体中にソリナールヌクレオチド(DMSO)をお
15重量%まで、好ましくは5～10重量%使用
することによって、そして/又は複製温度を30
～40℃、好ましくは35～40℃に上昇せしめ
ることにより達成することができ。

第4に、プライマーは好ましくはアデニン及び
シトシンをお50%含有し、そして不安定なハイ
ブリッドをもたらすであろうプライマーの3'末端の
反復の誘導するアデニン及びチミンを含有しない。

最後に、複製された生成物が制限酵素の使用に
よって検出される場合、プローブに内部(非-末
端)制限部位を有したければならない。

オリゴヌクレオチドプライマーは、任意の適当
な方法、例えば制限のホスホトリニステル法及び
ホスホジニステル法、又はその自動化された方法
を用いて複製することができ。このように1つ
の自動化された方法に於いては、ソリナールヌクレ
オチドが出発材料として使用され、そしてこ
れは Boehringer 等, Tetrahedron Letter

(1981), 22:1359-1362により記載されたようにして合成される。合成された固相支持体上でオリゴヌクレオチドを合成するための1つの位置が米国特許第4,452,055に記載されている。生物起源から単離されたプライマー、例えば制限エンドヌクレアーゼ消化物を使用することも可能である。

検出されるべきウイルスと関連する特異的核酸配列を含有しているか又は含有していると予想されるものである限り、複製された形態又は複製されていない形態のどちらの核酸の核酸を当該核酸として使用することができ、すなわち、この方法は、1本鎖又は2本鎖のDNA又はRNA、例えばメッセンジャーRNAを用いることができる。例としてRNAを使用すべき場合、該核酸をDNAに逆転写するために逆転写酵素及び/又はホストを使用する。さらに、それぞれの1つの鎖を含有するDNA-RNA ハイブリッドを使用することができ、

これらの核酸配列のいずれかの混合物を使用することができ、又は同一の又は異なるプライマーを

用いるこの発明の先行する核酸反応から生成した核酸を用いることもできる。増幅されるべき核酸配列は大きな分子の一部のみでもよく、又は特定の配列が全体核酸であるように適切に制限の分子として存在することでもできる。増幅されるべき配列は適切に制限した形で存在することは必要ではなく、それに核酸の混合物の小部分、例えば全長ヒトDNA中に含有されるウイルス-コード遺伝子の部分であってもよい。出発核酸は、同一のもよく又は異なってもよく、1より多くの所定の特定の核酸配列を含有していてもよい。この発明の方法は、1つの特定の核酸配列の多次生成のためのみならず、同一の又は異なる核酸分子上に位置する1より多くの異なる特定の核酸配列を増幅するために有用である。

核酸は任意の自然、例えば、動物のごとき高等生物からの天然DNA又はRNAから得ることができ、DNA又はRNAは体サンプル、例えば血液、組織材料、例えば髪、又は平滑細胞 (Amabile et al.) から、該核酸により、例えば

Amabile 等, *Molecular Cloning* (1982), 280-281により記載されている方法により抽出することができ、

サンプルが不純な例えば血液、血清又は細胞である場合、増幅の前にこれを、サンプルの細胞、核、組織、ウイルスサブド又は動物細胞膜を破る、そして核酸の鎖を露出しそして/又は分離するために効果的な試薬の一定量により処理することができ、鎖を露出しそして分離するためのこの処理 (lysis) 及び核酸完全溶解は、一般容易に増幅が起こることを可能にするであろう。さらに、サンプルを増幅試薬で処理するに先立ってサンプル中のAIDSウイルスを不活化する必要がない。サンプルを過心分離してペフィーコートを得、次にこれをカラムに送って白血球を得ることができる。次に、この白血球を処理して、増幅されるべきサンプルとして使用するために該白血球から核酸を抽出することができ、

この発明の方法により、任意の特異的核酸配列を露出することができ、必要とすれば、配列の

両側の十分な数の塩基が十分に詳細に知られており、その結果、所定の配列の異なる鎖に、そして1つのプライマーから合成された核酸生成物が、それがその核酸(標本)から分離された場合に、定量的な試みの核酸への該方のプライマーの延長のための標本として機能することができるよう配列上の相対位置に於いてハイブリダイズする2つのオリゴヌクレオチドプライマーを構築することができ、このことのみである。配列の両側の塩基についての知識が多くなるに従って、標的核酸配列のためのプライマーの特異性を大きくすることができ、そしてそれにより工程の効率が高くなる。増幅されるべき断片の正確な配列に誤る可能性のあるもののあいまいさが存在する場合に、この明細書に於いてこれ以後に使用されるプライマーなる用語は1個より多くのプライマーを意味することがあると理解すべきである。例えば、核酸配列が既知な配列情報から得られる場合、該配列コードの認識に基くすべての可能性あるコドンの多様性を代表する配列を含有する複数のプライマーを含

が各鎖のために使用されるであろう。この場合から1つのプライマーが複製されるべき所定の配列の末端と共に実質的に保存されるであろう。

特定の複製配列はその配列を含有する複製を鋳型として使用することにより形成される。アンプルの複製複製配列が2本の鎖を含む場合、それを鋳型として使用することができ、プライマー-延長反応物の合成と同時に又は別個の段階として、複製の2本の鎖を分離する必要がある。この鎖分離は適当な反応条件、例えば物理的手段、化学的手段又は酵素的手段により達成することができ、この明細書において使用される“反応”なる語はこれらすべての手段を包摂する。複製の鎖を分離するための1つの物理的手段は、複製が反応されるまでそれを加熱することを含む。典型的な加熱反応は約1〜10分間にわたる約80〜105℃の温度を用いる。鎖分離はまた、ヘリコマー(helicomer)として知られる装置からのもので、又はヘリコマー活性を有しそしてATPの存在下でDNAを反応することが知られている酵素

により2つの適切なプライマーを添加して反応を行うこともできる。

もとの複製が複製されるべき配列を模倣する場合、合成するプライマー-延長反応物はもとの複製と完全に又は実質的に相補的であり、そしてそれとハイブリダイズして同じ長さの2本の鎖のアプレックスが形成され、このアプレックスが単鎖分子に分離されるであろう。

複製の相補的な鎖が分離される場合、その複製がもともと2本鎖であっても又は単鎖であっても、それらの鎖は追加の複製鎖の合成のための鋳型として容易に使用される。この合成は、プライマーと鋳型とのハイブリダイゼーションが起る条件下で行われる。一般に、これは緩衝化された水溶液中で、好ましくは7〜9のpH、最も好ましくは約8のpHにおいて起こる。好ましくは、過剰モル(ゲノム複製について、通常約10¹:1=プライマー:鋳型)の2複製のオリゴヌクレオチドプライマーを、分離された鋳型鎖を含有する複製液に加える。しかしながら、この発明が断片化のため

RecA によっても誘導され得る。ヘリコマーによる複製鎖の分離のために適当な反応条件は Kaba Hoffmann-Berling, *CSR-Quantitative Biology*, 43:53 (1978) により記載されており、そして RecA を用いるための技術は C. Baddling, *Ann. Rev. Genetics*, 16:405-37 (1982) に記載されている。

複製されるべき配列を含有するもとの複製配列が単鎖である場合、それに1又は2複製のオリゴヌクレオチドプライマーを添加することにより、複製鎖の相補体が生じ得る。適切な1つのプライマーが添加された場合、該プライマー、鋳型のための複製及び下記の4複製のヌクレオチドトリホスフェートの存在下でプライマー-延長反応物が合成される。この生じ得る、複製鎖は複製鎖とハイブリダイズして同じ長さの鎖のアプレックスを形成することができ、このアプレックスは次に上記のように単鎖に分離され、2本の分離された相補的な単鎖が生じ得る。この方法として、複製鎖が

りに行われる場合、相補鎖の量が知られないから複製鎖の量に対するプライマーの量を正確に決定することができないことが理解される。しかしながら、複製問題として、複製されるべき配列が複製鎖の混合物中に含有される場合、添加されるプライマーの量に一般に相補鎖(鋳型)の量に対して過剰であるであろう。正確の効率を改善するため、大過剰モルが好ましい。

アポキシオリゴヌクレオチドトリホスフェート 4ATP、dCTP、dGTP 及び TTP もまた適当な量で、プライマーと別々に又は一般に混合物中に加え、そして得られる溶液を約90〜100℃、約1〜10分間、好ましくは1〜4分間加熱する。この加熱期間の後、溶液を直ちに冷却する。溶液はプライマー-ハイブリダイゼーションのために適当な温度である。冷却された混合物に、プライマー-延長反応を行うのに適当な複製(この明細書においては“鋳型のための複製”と称する)を加え、そして該複製において知られている条件下で反応を生じさせる。鋳型のための複製も、もしそれが

熱安定性であれば、他の試薬と一緒に加えることができる。この場合反応は、望ましいしそれより高い温度では重合のための試薬がもたらす望ましい温度に於いて起こることが出来る。従って、例えば、DNAポリメラーゼを試薬として使用する場合は、温度は一般に約40℃以下である。最も便利には反応は室温に於いて起こる。

重合のための試薬は、プライマー延長生成物の合成を促進するであろう任意の化合物又は系である。例えば、ポリ DNA ポリメラーゼ I、E. コリ DNA ポリメラーゼ I の K10000 断片、T4 DNA ポリメラーゼ、他の入手可能な DNA ポリメラーゼ類、ポリメラーゼ ミューナイン、ニトロ素、及びその他の酵素が含まれる。その他の酵素には熱安定性酵素類（すなわち、反応を生じさせるために十分に上昇した温度にかけられた後にプライマー延長を行う酵素類）が含まれる。これらは各核酸塩基に相補的であるプライマー延長生成物を生成するために適切な基質でのヌクレオチドの

結合を容易にするであろう。一般に、この合成は各プライマーの3'末端に於いて開始され、そして複製鎖に於いて3'方向に、合成が停止するまで進行し、異なる長さの分子を生成する。しかしながら、3'末端に於いて合成を開始し、そして他方向に進行する重合のための試薬も存在し、この場合も上記の同じ方法を使用することが出来る。

新たに合成された鎖及びその相補的な複製鎖は、もし複製配列が存在すれば、上記のハイブリダイゼーション条件下のもとで二本鎖分子を形成し、そしてこのハイブリッドがこの方法の次の段階に於いて使用されよう。次の段階に於いては、ハイブリダイゼーション条件下で処理されたサンプルを、前記の方法のいずれかを用いる変性条件にかけることにより、複製配列が存在すれば単鎖分子が得られる。

単鎖分子上で新たな複製が合成される。上記の条件下で反応を進行せしめるために必要であればさらに、重合のための試薬、ヌクレオチド及びプライマーを追加することが出来る。すなわち、合成

は各オリゴヌクレオチドプライマーの一端から始まり、そして複製の単鎖に於いて進行し、温度の複製をもたらすであろう。この段階の後、延長生成物の半分は2つのプライマーにより誘導された複製配列から成るであろう。

検出のために必要な複製に於ける複製配列を複製するために必要な追加的な変性条件及び延長生成物の合成の段階を反復することが出来る。さらに詳細に下記するように、生成された特定の複製配列の量は複製的に増強されるであろう。

最初の複製又は複製試薬から1複製より多くの特定の複製配列を生成することが望ましい場合は、対応する数の異なるオリゴヌクレオチドプライマーが使用される。例えば、2複製の異なる特定の複製配列を生じせしめるべき場合には4種類のプライマーを使用する。プライマーの内の2つは特定の複製配列の1つに対して特異的であり、そして他の2つのプライマーは第2の特定の複製配列に対して特異的である。このようにして、2つの異なる特定の配列のそれぞれがこの発明の方法によって

複製的に生成される。

この発明の方法は、各段階の後に新たな試薬を添加して反復的に行うことができる。あるいはすべての試薬を最初の段階で添加して同時に行うことができる。あるいは所与の数の段階の後に新たな試薬を加えて半段階的且つ半同時に進行することが出来る。熱感受性酵素の場合のように重合のための試薬を不活性化するであろう工程のとき変性方法を用いる場合、各核酸複製鎖の後に複製試薬を補充することが必要である。鎖分離段階のために標準的手段を使用する場合、同時的方法を使用することが出来る。同時的方法に於いては、反応混合物は、所望の配列を含有する複製鎖のほかに、鎖分離酵素（例えばヘリカーゼ）、鎖分離酵素のための適切なエネルギー源、例えばATP、4複製のヌクレオシドトリホスフェート、過剰量の変性オリゴヌクレオチドプライマー、及び重合のための試薬、例えばE. コリ DNA ポリメラーゼ I の K10000 断片を含むであろう。

同時的方法に於いて変性のために加熱を使用す

る場合、熱安定性酵素例えば熱安定性ポリメラーゼを使用することができ、このものは上昇した温度、好ましくは試薬に溶解して50℃〜105℃に於いて作用し、この混合物に於いて反応は予備状態の単鎖及び2本鎖から成るであろう。より短い長さの鎖については、約40℃〜50℃のより低い温度を使用することができ、上方温度は酵素が分解するであろう温度、又はそれより高ければ不十分なレベルのプライマー-ハイブリダイゼーションが生じるであろう温度に調整するであろう。このような熱安定性酵素は例えばA.S.

Kalish et al., *Biochimica*, 45, 644-651 (1980)により記載されている。この定温反応が成功するため、プライマーはそれらの3'末端を相互の6〜8塩基対以内を有する。この方法の取組は、すべての試薬が最初から存在しているにもかかわらず逐次的に進行するであろう。必要により追加の試薬を加えることができる。所望の特定の配列を生産せしめるために適切な時間が経過した後、生産の既知方法により酵素を不

活性化することにより、又は反応成分を分解することにより反応を停止せしめることができる。

温度はまた温度変化反応によっても行うことができ、この方法に於いては温度を逐次的に90℃〜105℃に上昇せしめることによって反応を可視化し、そして約35℃〜65℃で又はさらに低下せしめることにより熱安定性酵素を用いたがら延長及びアニーリングを可能にする。実験には温度を単に約95℃に上昇せしめ、約55℃で又はさらに低く37℃に低下せしめ、そして再び約95℃に上昇せしめ、そしてこのサイクルを所望の期間続ける。

自動化された方法の他の態様においては、安全装置、試薬添加装置及び反応領域を通して反応を循環することにより本発明の方法を逐次的に行うことができる。他の態様においては、プライマー-反応生成物の合成のために使用される酵素をカラム中に固定化することができる。他の反応成分はカラム及び加熱コイルを逐次的に通して、インプットにより逐次的に循環せしめることができ、こうし

て酵素を不活性化することなく、生産された反応を反応して定量化せしめることができる。

温度された生成物は、放射性プローブを使用しないでフアンプロットによりそれを分析することによって検出することができる。この方法においては、例えば、AIDSと関連する特定のレベルの配列を含有する末梢血リンパ球からのDNAの小断片を増幅し、そしてフアンプロット板により分析する。高レベルの増幅された断片により非放射性プローブの使用が容易となる。

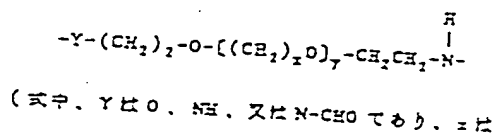
他の検出方法は、増幅された核酸配列とハイブリダイズすることができる標識されたプローブを用い、そして該プローブがハイブリダイズしたか否かを検定する検出を含む。この標識プローブは必然的に、ウイルス(例えばAIDSウイルス、HTLVII, ARV, LAV, LAY, LAYA, 又はそれらのバリエーション)のゲノムからの特定の配列を有する。そしてプライマー及び増幅される配列について上記したようにして選択される。AIDSについては、プローブは好ましくはAIDS

ゲノムの gag 領域から選択される。

1つのこのようなプローブは、1985年12月11日に公開されたヨーロッパ特許出願公開第164,054に記載されているオリゴヌクレオチドである。この方法においては、温度された反応を定量化し、そして検出中で、標識配列を特定のハイブリダイズし(プライマーにより含有される特定の保存された配列を含む)そして目の少なくとも1個の制限部位を含む増幅されたオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズせしめる。標識とプローブとの間で形成されたデュプレックスは制限部位を再構成し、そして制限酵素、例えばBamHI, PstI, DdeI又はDraIにより断片化された場合、ゲル電気泳動により全長プローブから分離され得る増幅されたプローブ断片を放出するであろう。次に、得られたゲルをオートラジオグラフ発現する。この方法による増幅された生成物の分析は迅速である。すなわち、数時間以内に結果が得られる。好ましくは、プローブは30〜50塩基の長さを持ち、そして標識されて

いる。また、制限酵素は好ましくは、検出されるべき配列がAIDS ウィルスに由来するものであるBlaI NI又はPvuIであり、そして検出されるべき配列がヘパドナウィルスに由来するものであるDdeIである。

増幅された生成物を分析するために使用される他の方法はドットプロット法である。この方法においては、増幅されたサンプルを膜上に直接スポットし、そして増幅されたプローブとハイブリダイズせしめる。膜は、分光法により、光化学法により、又は生化学的、免疫化学的もしくは化学的手段により検出される。この例には、アルコール性ホスファターゼの基質、 ^{32}P の基質、放射能標識、蛍光レベル、又はビオチンが含まれる。1つの例においては、ビオチン化プローブが使用され、この場合、ビオチンが次の式：

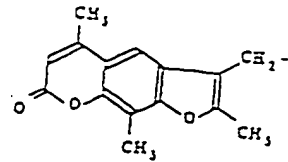


別の方法として、上記ドットプロット方式においては、プローブをまず膜上に必要であればアレイハイブリダイゼーション条件下でスポットし、そして次に増幅された生成物を前処理された膜にハイブリダイゼーション条件下で添加する。

ドットプロット法においては、膜をまずアレイハイブリダイズせしめそして次にプローブとハイブリダイズせしめなければならないので、この方法は前記のオリゴマー制限法に比べてより多くの時間を要する。しかしながら、急速に実行するウィルスについては、この方法は、限定された塩基のミスマッチを含有する配列が少なくとも1つのハイブリダイゼーション条件下で検出されるという利点を有し、前記オリゴマー制限法においては、ウィルスの可変性に基づき制限部位の停止をもたらす試薬を維持するすべてのウィルスは検出されたいであろう。

この発明はまた、使用されるプライマー及びプローブの容積を有するパッケージされた多量体を包んで成るキットに関する。このキットはまた、

1-4の数であり、そしてnは2-4の数である)で表わされるヌークレオチドに付加されている。このヌークレオチドは今更には次の式：



で表わされるアストラレン基に付加されている。このアストラレン基は、Courage-Tebbe 等、*Biochim Biophys. Acta*, 697 (1982) 1-5により記載されている様に、*ヤップを有する円形*プローブに挿入されそしてこれを発現する。この場合、ヤップを有する円形プローブの単独ハイブリダイゼーション領域はプライマーに結合される領域を含む。このビオチン化及びドットプロット法の詳細は米国特許第4,582,789及び第4,617,261にさらに十分に記載されている。ビオチン化プローブは放射性同位元素の存在を検出する。

プライマーに生成物を結合するための実用試薬、例えば酵素を含む容器、4種類のヌクレオシドトリホスフェートのそれぞれを含む容器、及び検出を検出する手段(例えば、酵素がビオチンで標識されたアビシン-酵素複合体)を含む容器を有することができる。さらに、このキットは、目的のウィルスゲノム(例えばAIDS)の配列を有する1もしくは複数の検出を含む陽性対照を収容する容器、及び/又はこのような検出を含む陰性対照を収容する容器を有することができる。さらに、このキットは、プローブ中の配列中に含まれる部位において、真の配列を含む検出を形成せしめることができる各型制限酵素のための容器を有することができる。

この例は、この発明の様々な態様を示示するが、この発明の範囲を限定することを意図するものではない。これらの例においては、特にことわらない限り、すべての数及び量は条件については任意基準であり、そして図式については任意基準であり、そして図式はてて表わす。

例1.

増幅されるべき所望の配列は、1943K、342、357、361、368H、207、307、308B、323、326、及び340として同定され、Regional Oncology Center, SUNY Upstate Medical Center, Syracuse, ニューヨーク13210のBernard Pellet 博士から入手した11個の符号が付されたDNAサンプル中に含有される。増幅されるべき配列、プライマー、及びプローブは前記のドットマトリクスプログラムにより同定した。ここで、選択された配列ウィンドウは20塩基対以上の長さであり、配列をAIDSウイルスの保存された領域内で選択した。コードされたサンプルをさすPellet 博士によりインターコイキン-2の符号下で培養し、ウイルスの符号について試験した。次に、下記の方法によりDNAを抽出した。

1. $1 \sim 2 \times 10^6$ の培養された細胞を試験管中で20μlのドナソル緩液ナトリウム細胞溶解液(1% SDS, 150 mM NaCl, 25 mM

Na_2EDTA)により溶解した。

2. プロテイナーゼKの5μl/μl濃度400μlを各試験管に加え、そして37℃にて一エインキュベートした。

3. DNAを、フェノール、及び CHCl_3 :インプロビルアルコールにより次々と抽出し、そして次にメタノールで沈殿せしめた。

4. DNAをガラス板上に巻き付け、そして1×TE緩液(10 mM Tris, 1 mM Na_2EDTA , pH 7.5)中に再溶解し、そして1×TE緩液に対して十分に透析した。

1. プライマーの合成

それぞれSK01及びSK02と称する2つのオリゴヌクレオチドプライマーを下記の方法により調製した。

5'-CAGCGGACCTAGAACGAT-3' (SK01)
5'-CTTCTGATCCTGTCTGA-3' (SK02)

SK01及びSK02は、HTLVⅢ単離体BH10のヌクレオチド900及び1006の間の107塩基の領域をもちょうに選択した。

A. 自動合成

Biosearch 及び Caruthers, Tetrahedron Letters (1981) 22:1859-1862の方法に従って合成されたジニチルホスホリミドを、ヌクレオチドで修飾された固着された孔を有するガラス支持体に、デオキア(Biosearch) 8AM-1を用いて逐次合成せしめた。この方法は、ジクロロメタン中トリクロロ酸を用いるジトリチル化、活性化誘導体としてベンゾトリアゾールを用いる結合、並びにナトリウムヒドロキシ及びピリジン中水部及びジニチルアミノピリジンを用いるカップリングを含む。サイクル時間約30分間であった。各段階における収率は本質的に定量的であり、そしてジトリチル化中に放出されるジニチルトリチルアルコールの収率及び元々の試験により決定された。

3. オリゴヌクレオチドの脱塩及び精製方法

固着支持体をカラムから取り出し、そして塩析ナトリウム中で強酸にて4時間1μlの濃水酸化アン

モニウムに暴露した。次に、支持体を強酸により除去し、そして部分的に保護されたオリゴヌクレオチドを含有する溶液を5時間にかたり55℃にした。アンモニウムを除去し、そして強酸を分液用オリグリンアミドゲルに適用した。3リットル/μlにて30分間電気泳動し、この後生成物を含有するバンドを紫外線プレートのUVシャドウィングにより同定した。バンドを切り出し、そして1μlの蒸留水により4℃にて一夜抽出した。この溶液をアルナック(Altech) RP18カラムに適用し、そして1%酢酸アンモニウム緩液(μl 50)中アセトニトリルの7~13%のグラジエントにより抽出した。抽出を260nmに於けるUV吸収によりモニタリングし、そして適切な量を採り、一定の容量までのUV吸収により定量化し、そして真空蒸気中で乾燥して再溶解した。

C. オリゴヌクレオチドの修飾及び精製
精製されたオリゴヌクレオチドの試験アリートをオリゴヌクレオチドキナーゼ及び $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATPにより ^{32}P 標記した。標記された化合物を、

50 μmol/Lにて45分間にわたる電気泳動の後、14~20 μmol/Lのポリアクリルアミドゲルのオートラジオグラフィにより検出した。この方法に分子量を測定する、ヘビコニステラセ及び高アルカリ性ホスファターゼによりオリゴデオキシリボヌクレオチドをヌクレオチドに消化し、そして反相HPLCカラム及び10 μmol/Lのアセトニトリル、1 μmol/Lのアミノニウム塩を用いてオリゴヌクレオチドを分離し、そして測定することにより、塩基組成を決定した。

1. 複製反応

Pol. α₃ 遺伝子からの11個の断片が付されたDNAアンプルの各々からの1 μgずつのDNAを、10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM 塩化ナトリウム及び1.0 mM 塩化マグネシウムから成り、100 pmolのアプライマーSK01, 100 pmolのアプライマーSK02, 及び150 μmolずつのdATP, dCTP, dGTP及びTTPを含有する緩衝液100 μLに加えた。

得られた断片を10分間100℃に加熱し、そ

して³²P-ATP (約7,200 Ci/mol)と37℃にて90分間反応せしめることによりプローブを複製した。次に、全量を25 mM EDTAにより100 μLに調整し、そしてTCA試薬により活性性を決定するためにアリコートを取り出した。複製反応を用いて複製されたプローブを溶解し、そしてTris-EDTA (TBE) 緩衝液 (89 mM Tris, 89 mM 酢酸, 2.5 mM EDTA, pH 8.3) 中18 μmol/Lのポリアクリルアミドゲル上で500 Vの電気泳動により検出した。オートラジオグラフィによる位置決定の後、複製されたプローブを含有するゲルの部分を切り出し、溶解し、そして0.3 μLのTBE緩衝液に4℃にて一夜溶出した。反応生成物のTCA試薬は、活性性が2 Ci/molであり、そして最終濃度が20 pmol/μLであることを示した。

IV. 複製されたゲノムDNAとプローブとのハイブリダイゼーション及び3:1HIによる消化

10 μLの複製されたDNA (71 μgのゲノムDNAに相当する濃度を意味) を1.5 μLのミクロ

して2分間にわたる電気泳動後、その後1 μmol/LのE. コリDNAポリメラーゼのK1.000断片を含有する2 μLを添加した。室温にて2分間反応を行わせ、その後95℃にて2分間にわたる加熱することにより不活性化した。次に、プライマーアニーリング、K1.000による延長 (数分間) 及びポリメラーゼの添加を19回反復した。

2. オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成及びリン酸化

次の配列:

5'-AATCTGCGCTGTTACAAACATCAGAAAG-3'

(配列中・は複製を示す) を含有する複製されたDNAプローブSK03をセクシーン1に記述した方法により合成した。10 pmolのプローブを、70 mM Tris (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1.5 mM スペルミン及び2.5 mM リナオスレイトールを含有する緩衝液40 μL中4ユニットのT4ポリヌクレオチドキナーゼ及び50 pmol

プーゼンターブに入れた、そして20 μLのTE緩衝液により30 μLの最終容積とした。アンプルを95℃にて10分間反応せしめた。0.2 pmolのSK03プローブを含有する10 μLの0.6 M NaClをチューブに加え、ゆっくりと混合し、緩衝液を置換し、そして55℃の加熱ブロックに1時間溶した。10 μLの0.6 M MgCl₂及び1 μLの3:1 HI (10ユニット) を加え、そして再アニーリングしたDNAを55℃にて30分間消化した。4 μLの75 mM EDTA及び6 μLのトラッキング色素を60 μLの最終容積に加入することにより反応を停止せしめた。

緩衝液を0.2 μLのクロロホルムで抽出し、そして13 μLの反応混合物 (約15 μgのゲノムDNA) を、電気泳動装置中30 μmol/Lのポリアクリルアミドゲル上に沈着した。ブローフェノール-色素フロントが泳動から3.0 cm移動するまで、ゲルを約300 μmol/Lにて1時間電気泳動した。ゲルの上1.5 cmを除去し、そして残りのゲルを小さくとも一三、二回の複製スクリーンを用いて-70

てにて分析した。

Y. 結果の考察

オートラジオグラフはサンプル 353E のみに AIDS の DNA 配列が存在することを示した。このサンプルが唯一の HTLV 陽性 DNA であることが全て見出された。他の 10 個のサンプルは次の通りであった。(a) 194BK = 白血病患者からの DNA (ウイルスは単離されず)、(b) 342 = HTLV I、(c) 367 = HTLV I、(d) 351 = HTLV I、(e) 207 = 活動的 (active) 白血病患者から (反復感染)、(f) 307 = HTLV I プロトタイプ細胞系 (最高のウイルス DNA)、(g) 3083 = HTLV I、(h) 323 = HTLV I、(i) 326 = HTLV I、及び(j) 340 = 活動的 (active) 白血病患者 [(a) と比較] を有する患者から。

従って、使用されたプライマーは、プローブが正しく配列を検出することを可能にするために DNA を増幅することができた。他のサンプルに追加の陽性サンプルを用いて感度のテストであった。

の親水性領域の増幅を得るために選択した。

SK19 は、増幅された DNA にアニールした場合、3.1 NI 部位を再増幅する。この結果による増幅が 4-mer を放出する。

5.3 でのハイブリダイゼーション及び電気泳動のオートラジオグラフは、例 1 に示して見出された HTLV 陽性サンプルのみを陽性として示した。すべてのサンプルにおいて生ずるバックグラウンドバンドはハイブリダイゼーション及び電気泳動の温度を 53 から 60 度へ上げることにより消滅した。上昇した温度がプローブの非特異的ハイブリダイゼーションを最小にしたものと予想される。

例 3.

3.1 NI 部位を含有する 135 塩基対を有する 5'x の親水性領域をコードする 130 bp DNA 断片 (HTLV 陽性株 BH10 のスクレオナド 1470-1649) を、必ず 10 個のオーバーラップするオリゴマーを T4 DNA リガーゼを用いて増幅することにより増幅した。オリゴマーを第 2 図に示す。

た。37 度における 10 分の DMSO (2 次反応の形成を最少にする) の存在下での増幅は HTLV 陽性サンプルを唯一の陽性サンプルとして示した。

例 2

この例においては、例 1 に記載したのと同じ方法を利用したが、使用したプライマーは SK24 及び SK18 と称し、次の通りであった。

5'-ATCCCACTAGGAGAA-3' (SK24)

5'-TTATCTCCAGAAATCC-3' (SK18)

SK24 に代るプライマーはプライマー SK25 であった。

5'-ATAATCCACCTATCCAG-3' (SK25)

使用したプローブ SK19 は次の配列:

5'-ATCTCCAGAAATCCAGAAATCCAGAAATCCAG-3'

(配列中、* は複製を示す) であった。このプローブをクレンジングに記述したのと同様にして増幅した。SK24 及び SK18 は、HTLV のスクレオナド 1552-1642 の 5'x の親水性領域の増幅を得るために選択した。SK25 及び SK18 は、HTLV のスクレオナド 1541-1642 の 5'x

次に、得られた断片を、商業的に入手できる

M13mp10W の 3.1 NI 部位にクローン化した。配列決定されたクローンはいずれも正確な所望の配列を有していなかった。しかしながら、第 3 図に示す 2 つのクローン (図中 X は遊離子中の複製を示す) を用いて、クローン M13mp10W:

C7 の 8p.1 / 3.1 XI 断片をクローン M13mp10W:

D6 の 3p.1 / 3.1 XI 断片で置換することにより正しい配列を有するクローンを生成した。

M13mp10W:C7 からの DNA を 8p.1 及び 3.1 XI で増幅し、アルカリ性ホスファターゼで処理し、そして六ベクナー含有断片をアガロースゲルから精製した。クローン M13mp10W:D6 からの

3p.1 / 3.1 XI DNA 断片を、上記と同じ条件で

増幅した後にメリアクリルアミドゲルから精製した。M13mp10W:C7 及び M13mp10W:D6 からの

複製された断片を並置し、そしてアメリカン・

タイプ・カルテュア・コレクションから入手可

能な E. コリ DG98 株に形質転換した。M-13-

CAG と称する得られたクローンは正しい配列を有

有してあり、そして1986年1月8日に、

ATCC 40218としてATCCに寄託された。

このM-13-GAGを使用して前記のギャップを有する円形プローブを合成することにより、アイントープを使用しないドットプロット法において、増幅されたアンプレを解析することが出来る。

増幅された生成物を2つのプライマー8K23及び8K28を用いて増幅することが出来る。これらのプライマーはM-13-GAG中の全180merを占め、そして次の配列を有する。

5'-ATGAGAGAACCAAGG-3' (8K23)

5'-GCTTGTCTTATGTCACAG-3' (8K28)

スクレオナド1468及び1649の間を増幅するために選択されたこれらのプライマーは、プローブSK19を用いてすでに試験されており、そしてHTLVアンプレを効果的に検出することが見出された。

例4

例2に記載した方法を用いてDr. Poieszに

アンプレはAIDS又はARC患者から単離されたDNAであり、Poiesz博士により同定されたHTLV単離体、LAL単離体及びAIDS関連ウイルス(AAV)が含まれた。さらに、AIDS患者と感染因子感染したことがある抗体陽性、感染因子抗体陽性の感染したことがある両者の両者のプライマー対により陽性と判定された。SK17-8K18、及び8K24-8K18プライマー対はSK01-SK02プライマー対に比べて多くの陽性を検出する様であった。

感染因子アンプレ(正常T細胞、感染因子ウイルス又はHTLV)はいずれもこの発明のアプリケーションにおいて陽性ではなかった。この発明の試験は、感染因子抗体によっては陽性であった10個の感染因子アンプレを陽性として判定した。他方、感染因子抗体陽性である5個のアンプレ(5個の内3個は±)はこの発明の試験において陽性であった。71個すべてのアンプレはELISA陽性であることが証明され、ELISAはAIDSウイルスについて非常に感別力ある又は特異的試験ではないことが示された。上記の例は、AIDSウイルスDNAがAIDS又は

り抽出されたDNAの71個の番号を付されたアンプレを有す。例1のSK01及びSK02プライマー対又はSK17及びSK18のプライマー対を用いてこれらのDNAにより分析した。SK13は例2に於いて定義されてあり、そしてSK17は次の配列:

5'-CCAGTAGGAGAAAT-3'

を有し、これはHTLVのスクレオナド1555-1642の~~545~~の塩基塩基領域を増幅するため選択されたものである。プライマー対SK17及び8K18を用いる増幅を、10重量%のDMSOの存在下で37°Cにおいて、しかし他の例1の方法に従って行った。増幅の後、プローブ8K03(例1)又は8K19(例2)を用いて、例1の方法によりDNAを検出した。幾つかのあいまいなアンプレはさらに例2のSK18及びSK24のプライマー対を用い、そして塩基対でプローブ8K19を用いてさらに分析した。

これらの結果が示すところによれば、この発明の試験により陽性として判定されたすべてのアン

ABCを有する患者からの血液、リンパ系細胞、及び感染因子により感染されたセルラインにおいて判定され得ることを示している。

例5

この例は、この発明の試験が、ウイルスを有する必要がある必要がなく、鮮血の末梢単核細胞中のAIDSウイルスDNA配列の同定に直接適用され得ることを示す。

AIDS患者からの番号を付された血液アンプレをPoiesz博士の方法に従って処理した。まずこれらを低速遠心分離(約3000Xg)を用いて遠心分離してすべての細胞をペレット化し、こうしてペフーコートを得た。ペフーコートをアイソームハイパーグロブリンカラムに送し、そしてカラムから白血球を集めた。例1に記載した方法によって白血球からDNAを抽出した。

それぞれ例2及び4に記載されているSK17及びSK13のプライマー対を用いて、DNAを10重量%のDMSOの存在下37°Cにて、例1に記載した方法に従って、1ユニット、2ユニット及び4

使用することにより増殖のシグナルが生ずる。従って、本発明の技術を用いてヘパドナウイルスの増殖が可能である。

プライマー DM06 及び DM03 の代りに、次の配列：

5'-GCGGATGCGATCTTCTTATCTGCTCTGCG-3' (MD14)

5'-GCGAAGCTTCTTACGCTTAAAGTGTACCC-3' (MD13)

を有するプライマー MD14 及び MD13 を用いて増殖の実験を行った場合、結果は同じであった。これらのプライマーは、ヘパドナウイルスのニモローブ遺伝子から選択した。

次の表が行われた。

株	寄 託 日	ATCC 号
M13-GAG	1986年1月8日	40218

この表に、特許手続のための発生物の寄託に契約承認に關するアライメント条約及びその規則の制定(アライメント条約)のもとになされた。これは、寄託の日から30年における生存特許費の減

税を保障する。この発生物は ATCC によりアライメント条約の承認のもとに、及び申請者と ATCC との合意に従って入手可能にされる。この合意は、特許物の子孫の永久的な満足されたい入手可能性を公衆に、或る米国特許活動の又はは米国もしくはは外国の特許出願の公衆への公開の送、いずれが最初に到来するにしても保証し、そして、特許物の入手可能性を、35 USC § 122 及びこれに當く長官規則 (386 DC 638 への特別な言及を伴う 37 CFR § 1.14 を含む) によって米国特許局局長によりその資格を有すると決定された者に保証する。本出願人は、表に中の特許物が適切な条件下に培養された場合に死滅もしくは失われた又は没収した場合に、通知の送これが同じ培養物の生存サンプルにより速やかに置き換えられることを承諾する。寄託された遺伝子の入手可能性は、いずれかの政府の権威のもとにその国の特許法に従って認められた権利に違反してこの発明を実施するための特許であると解してはならない。

以下を白

4. 図面の簡単な説明

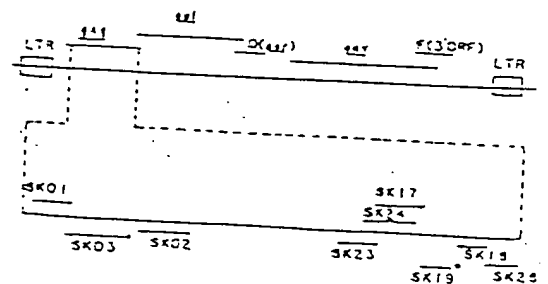
第1図は、長末端反復 (LTR) 非コード領域及び C₁₀、C₂₀、C₃₀、Q (又は C₄₀) 及び P (又は P_{ORF}) コード領域からなる完全な AIDS ゲノムの模式図であり、そしてこの発明の例のためこれらの部位からプライマーを選択したかを示す。

第2図は、増殖された発生物を増出するためのドットプロットに於いて使用すべきハイブリダイゼーションプローブのための180bp DNA 断片を形成するために選定された AIDS 配列の10個のオリゴヌクレオチドの模式図である。

第3図は、AIDS ウイルスと同じ配列を得るために、複製配列の複製を含む2つのクローン M13mp10W:C7 及び M13mp10W:D5 を示したかを示した図である。生成するクローン M13-GAG はドットプロットに於いてハイブリダイゼーションプローブとして使用するための180bp 挿入部を含有する。

以下を白

FIG. 1



*- 5'端

FIG. 2

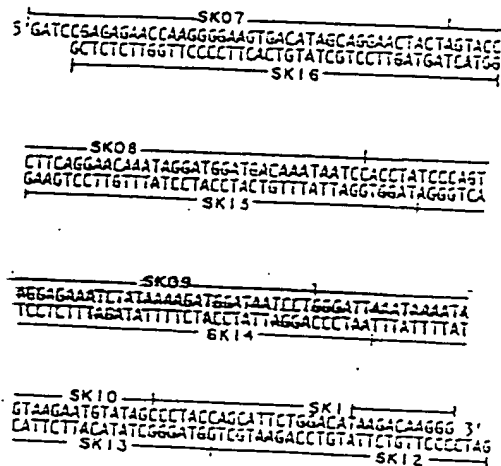
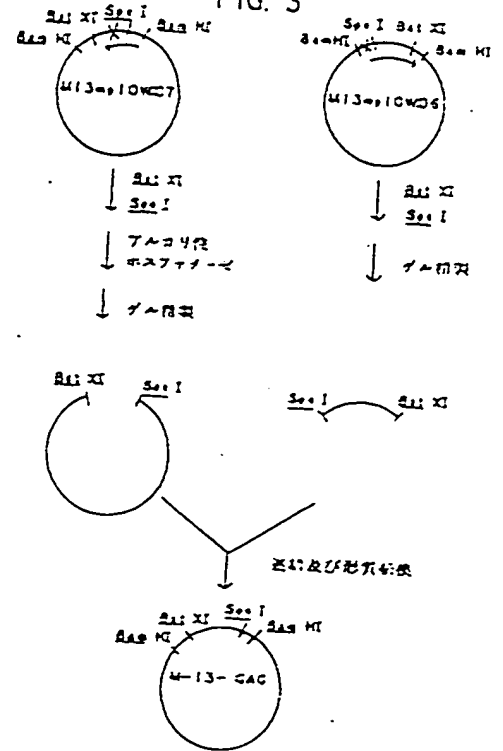


FIG. 3



第1頁の続き

発明者

1985年11月25日 米国 (U.S.) 935581

1985年11月25日 米国 (U.S.) 934955

発明者

シルレイ イー クワ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94563, サン ラミ
オク ジ, ロウモンド ナークル 611